体外診断用医薬品

この添付文書をよく読んでから使用してください。

＊2013年 5 月改訂（第2版）
2012年11月作成（第1版）

製造販売承認番号：22400AMX01422000

KRAS遺伝子変異検出キット 84053000

OncoGuide KRAS遺伝子変異検出キット

【重要な基本的注意】

1．本製品は大腸がんの抗EGFR抗体医薬投与前の検査として有用性を確認しておりますが、膵がんおよび肺がんなどその他のがんについては有用性を確認していません。大腸がんの抗EGFR抗体医薬投与前の検査以外には使用しないでください。
2．本製品はKRAS遺伝子のコドン12およびコドン13内での7種類の変異（G12A、G12C、G12D、G12R、G12V、G12S、G13D）を検出するキットです。これ以外の稀な変異については、検出対象としていません。

【全般的な注意】

1．本製品は、体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2．診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて、総合的に判断してください。
3．添付文書に記載された使用目的および用法・用量に従って、使用してください。記載された使用目的および用法・用量以外での使用については、結果の信頼性を保証しかねます。
4．使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。
5．試薬および消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などは、他の目的に転用しないでください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1．標準DNAプレート　3枚
① 野生型標準DNA
野生型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
野生型ダブシル（Dab）標識DNA
② G12A型標準DNA
G12A型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12A型ダブシル（Dab）標識DNA
③ G12C型標準DNA
G12C型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12C型ダブシル（Dab）標識DNA
④ G12D型標準DNA
G12D型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12D型ダブシル（Dab）標識DNA
⑤ G12R型標準DNA
G12R型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12R型ダブシル（Dab）標識DNA
⑥ G12V型標準DNA
G12V型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12V型ダブシル（Dab）標識DNA
⑦ G12S型標準DNA
G12S型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G12S型ダブシル（Dab）標識DNA
⑧ G13D型標準DNA
G13D型カルボキシフルオレセイン（FAM）標識DNA
G13D型ダブシル（Dab）標識DNA

2．プライマーミックス溶液　1×420μL
① フォワードプライマー
② リバースプライマー
③ デオキシヌクレオシド三リン酸混合物（dNTP）
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸（dATP）
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸（dCTP）
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸（dGTP）
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸（dTTP）

3．F-PHFA Buffer　3×1000μL
エチレンジアミン四酢酸（EDTA）

【使用目的】

生体由来の組織中のKRAS遺伝子変異の検出
（KRAS遺伝子変異の判定の補助）

【測定原理】

本製品はF-PHFA法を用いて、生体由来の組織から抽出したゲノムDNA中のKRAS遺伝子のコドン12およびコドン13内での7種類の変異（G12A、G12C、G12D、G12R、G12V、G12S、G13D）を検出するキットです。

【操作上の注意】

1．PCRでのキャリーオーバーコンタミネーションの防止

・PCRでのキャリーオーバーコンタミネーションを防ぐために、PCRの準備を行う部屋とPCR産物を取り扱う部屋は、厳密に区別してください。

2．測定検体の性質、採取方法

2-1 測定検体

・本製品の測定検体には生体由来組織（FFPE組織または新鮮凍結組織）から抽出したゲノムDNAを使用してください。
・生体由来組織の選定・採取に当たっては、日本臨床腫瘍学会「大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス 第1版」[1)]を参照してください。

2-2 FFPE組織切片を使用する場合の注意

・FFPE組織切片からゲノムDNAを抽出する場合、隣接する切片からHE染色スライドを作製して腫瘍部を確認してください。また、腫瘍部削り取り（マニュアルマイクロダイセクション）を実施する際は、このHE染色スライドをガイドとして、腫瘍部を削り取ります。なお、腫瘍部削り取りの際に、削り取った組織片が飛散するなどしてコンタミネーションの原因とならないように注意してください。
・FFPE組織切片を使用した本製品の臨床性能試験においては、以下に示すように腫瘍部削り取り実施の有無によらず判定結果が一致しました。

腫瘍部削り取り実施の有無による本製品の判定結果の比較

遺伝子型	腫瘍部削り取りあり	腫瘍部削り取りなし
野生型	106	106
変異型	59	59
合計	165	165

2-3 新鮮凍結組織を使用する場合の注意

・本製品に関しては、新鮮凍結組織から抽出したゲノムDNAを用いた臨床性能試験は行っていません。
しかしながら、本製品の測定原理から、一定以上のPCR産物が得られれば、KRAS遺伝子変異の検出は可能と考えられます。また、一般的には、FFPE組織切片から抽出されたゲノムDNAよりも、新鮮凍結組織から得られたゲノムDNAの方が品質は高く、PCRの再現性も高いと言われています（Solassol, J. et al., Int. J. Mol. Sci. 12, 3191-3204（2011））。また、本製品の臨床性能試験でのFFPE

組織を使用した結果から、本製品はダイレクトシークエンシング法と高い相関性を得ています。以上のことから、新鮮凍結組織を使用してもFFPE組織を使用した時と同等の精度で、本製品によるKRAS遺伝子変異の検出は十分可能と考えます。なお、本製品の開発過程においては、新鮮凍結組織を使用してKRAS遺伝子変異検出を行っており、ダイレクトシークエンシング法と同等以上の感度が得られています（Kitano, S. et al., 8th AACR/JCA joint conference in Hawaii（2010）A46:p88-91）。

・新鮮凍結組織を使用する場合は、日本臨床腫瘍学会「大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス 第1版」[1] に注意喚起されている通り、正常部位をできる限り取り除き、専門医がほぼ腫瘍組織からなると判断したものを使用してください。

3．検体の調製

3-1 ゲノムDNA抽出

・検体の種類に応じた任意のDNA抽出キットを用いて検体よりゲノムDNAを抽出します。操作方法は使用するDNA抽出キットの取扱説明書に従ってください。
・抽出したゲノムDNAの保管は、用いたDNA抽出キットの説明書に従ってください。
・ゲノムDNAの抽出作業は、必ずPCR産物を取り扱わない部屋で行ってください。
・複数の検体を同時に扱う場合は、エアロゾルの飛散や手袋を介する汚染などに十分注意し、検体間のクロスコンタミネーションを防いでください。
・ピペット用チップはフィルター付きのものを使用し、毎回交換してください。

3-2 PCR反応

・任意のTaq DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行うことが可能ですが、TaKaRa Taq Hot Start Version を推奨します。操作方法は使用するTaq DNAポリメラーゼ製品の取扱説明書に従ってください。また、以下についても注意してください。
・ゲノムDNAは、全量で20～100ngの範囲になるように調製してください。また、PCR反応に添加するゲノムDNA溶液の容量は、10μLを超えないようにしてください。ゲノムDNAの定量は、吸光度測定法やピコグリーン法などで行ってください。なお、吸光度測定でゲノムDNAの定量を行う場合は、混入するRNAなどにより測定値は実際とかなりずれることがあります。
・PCR反応ごとにPCR産物のキャリーオーバーによるコンタミネーションの有無を調べるため、ゲノムDNAの代わりに同容量の精製水を用いた陰性コントロールのPCR反応を必ず行ってください。
・PCR反応を行う容器は、チューブ、プレートいずれでも構いません。プレートを用い、シールで蓋をする場合は、蒸発しないようにシールがプレートにしっかりと接着していることを確認してください。

3-3 プライマーミックス溶液

・プライマーミックス溶液は室温で融解し、融解後は十分混合してください。融解後は室温で取り扱って差し支えありませんが、30分以上室温で取り扱う場合は、氷上あるいは冷蔵庫で保管しながら使用し、使用後は速やかに－25～－15℃で冷凍保存してください。

4．F-PHFA反応の操作

4-1 標準DNAプレート

・標準DNAプレートは使用する前に室温に戻しておき、使用直前にプレートシールを静かにはがしてください。
・蛍光色素の劣化を防止するため、標準DNAプレートは使用直前まで遮光アルミ袋で保管してください。長時間蛍光灯下で放置すると蛍光色素が劣化し性能に影響を与えることがあります。
・標準DNAプレートを測定装置に装着する際、プレートの向きを間違えないように注意してください。
・標準DNAプレートは、上下逆さにしないでください。

4-2 F-PHFA Buffer

・F-PHFA Bufferは室温で融解し、融解後は十分混合してください。使用時は室温で取り扱って差し支えありませんが、使用後は－25～－15℃で冷凍保存してください。

4-3 その他

・PCR増幅液の容器を開封する際（チューブのキャップを開ける際、あるいはプレートのシールをはがす際）は、PCR産物の飛散に十分注意して行ってください。プレートからはがしたシールには、PCR産物が付着していることが考えられますので、PCR産物を取り扱ったピペット用チップなどと同様にビニール袋などに密閉しPCR産物による汚染がないように十分注意してください。
・F-PHFA反応の測定後は、標準DNAプレートからリアルタイムPCR用マイクロプレートカバーシールをはがさずに、そのまま廃棄してください。シールをはがすと、PCR産物による汚染の危険性が高まります。

5．妨害物質・妨害薬剤

・ホルマリン、パラフィン、キシレン、エタノール、TE Buffer およびQIAamp Wash Buffer の本製品の測定への影響を検討した結果、ゲノムDNA抽出および本製品の操作で混入すると考えられる程度の量では、判定結果への影響は認められませんでした。
・DNA抽出に用いたプロテアーゼKは、PCR反応を阻害する可能性がありますので、十分失活させるか、混入量を最小限にするため、ゲノムDNA抽出の洗浄操作において十分注意してください。

6．その他の留意事項

・本製品を取り扱う際には、微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。

【用法・用量（操作方法）】

1．試薬の調製方法

・各試薬は、室温に戻してから使用してください。
① 標準DNAプレート
そのまま用います。
② プライマーミックス溶液
そのまま用います。
③ F-PHFA Buffer
そのまま用います。

＊2．別途必要な試薬・器具・機器・ソフトウェア等

・ゲノムDNA抽出キット
・リアルタイムPCR装置［推奨品:CFX96リアルタイムPCR解析システム、CFX96マネージャーソフトウェア（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）］［LightCycler 480 System II、LightCycler 480 Software（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）］、［Applied Biosystems 7500 Fast DxリアルタイムPCR システム、ABI 7500 Fast System SDS Software（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）］
・Microsoft Office Excel（バージョン:2007以降）
・サーマルサイクラー（100μL容量の反応が可能なもの）
・Taq DNAポリメラーゼ［推奨品:TaKaRa Taq Hot Start Version（10×PCR Buffer含む）］
・リアルタイムPCR用マイクロプレートカバーシール
・マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（フィルター付き）
・PCR用容器:マイクロチューブあるいはマイクロプレート（100μL容量の反応が可能なもの）
・精製水

＊3．操作方法

3-1 ゲノムDNA抽出

・「**【操作上の注意】3-1 ゲノムDNA抽出**」を参考に、生体由来組織よりゲノムDNAを抽出してください。

3-2 PCR反応

・PCRでのキャリーオーバーコンタミネーションを防ぐために、PCRの準備を行う部屋とPCR産物を取り扱う部屋は、厳密に区別してください。

・「**【操作上の注意】3-2 PCR反応、3-3 プライマーミックス溶液**」を参考に、生体由来組織より抽出したゲノムDNAのPCR反応を行ってください。

・任意のTaq DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行うことが可能ですが、TaKaRa Taq Hot Start Version を推奨します。操作方法は使用するTaq DNAポリメラーゼ製品の取扱説明書に従ってください。

① PCR反応液の調製

プライマーミックス溶液を使用して、PCR反応液を全量100μLになるように調製してください。

TaKaRa Taq Hot Start Version（推奨品）では、表1に示す容量（1検体分）で調製します。

表1．PCR反応液の調製（1検体分）

プライマーミックス溶液	10μL
TaKaRa Taq Hot Start Version 5U/μL	0.5μL
10×TaKaRa Taq Buffer（Mg^{2+} plus）	10μL
ゲノムDNA	1～5μL
精製水	up to 100μL

1検体あたりのゲノムDNA量は、全量で20～100ngの範囲になるように調製してください。添加するゲノムDNA溶液の容量は、10μLを超えないようにしてください。ゲノムDNAの定量は、吸光度測定法やピコグリーン法などで行ってください。

プライマーミックス溶液は室温で融解し、融解後は十分混合してください。融解後は室温で取り扱って差し支えありませんが、30分以上室温で取り扱う場合は、氷上あるいは冷蔵庫で保管しながら使用し、使用後は速やかに−25～−15℃で冷凍保存してください。

プライマーミックス溶液にはdNTP（終濃度：各250μM）が含まれていますので、dNTP添加の必要はありません。

② PCR反応

PCR反応液100μLを用い、所定の反応条件にてサーマルサイクラーでPCR反応を行ってください。

TaKaRa Taq Hot Start Versionでの推奨反応条件（サイクル等）は、以下になります。

95℃　3分
95℃　20秒 ←┐
57℃　30秒　├ 50サイクル
72℃　30秒 ←┘
72℃　5分
4℃　Hold

また、PCR反応ごとにPCR産物のキャリーオーバーによるコンタミネーションの有無を調べるため、ゲノムDNAの代わりに同容量の精製水を用いた陰性コントロールのPCR反応を必ず行ってください。

③ PCR産物のアガロースゲル電気泳動による確認

以下の条件でアガロースゲル電気泳動を行い、PCR産物のバンドを確認してください。

PCR増幅液の容器を開封する際は、PCR産物の飛散に十分注意して行ってください。

電気泳動操作はPCR産物による汚染の危険性がありますので、十分配慮して操作してください。

・アガロースゲル濃度：4%
・印加電圧：100V、泳動時間：約20分間
・使用サイズマーカー：20bp DNA Ladder
・アプライ：PCR増幅液2μLとLoading Bufferを混合しアプライする。

PCR産物の全長は54bpですので、60bpのサイズマーカーのすぐ下の位置にバンドは泳動されます。

陰性コントロールのPCR増幅液によるアガロースゲル電気泳動の結果、検体のPCR産物と同じ位置にバンドが見られた場合は、PCR産物のコンタミネーションが強く疑われます。再度陰性コントロールのPCR反応をやり直し、解決されなかったときは新たな試薬を用いてください。

陰性コントロールのPCR増幅液によるアガロースゲル電気泳動の結果、検体のPCR産物よりやや短いPCR産物のバンドが見られることがありますが、プライマー同士による非特異反応と考えられ、判定の結果には影響ありません。

3-3 F-PHFA反応

・「**【操作上の注意】4．F-PHFA反応の操作**」を参考に、F-PHFA反応を行ってください。

① F-PHFA反応液の調製

PCR増幅液とF-PHFA Bufferを表2に示す容量（1検体分）にて混和し、F-PHFA反応液を調製してください。陰性コントロールのPCR増幅液も、検体と同様にF-PHFA反応液を調製してください。

表2．F-PHFA反応液の調製（1検体分）

PCR増幅液	95μL
F-PHFA Buffer	75μL
全量	170μL

F-PHFA Bufferは室温で融解し、融解後は十分混合してから使用してください。使用時は室温で取り扱って差し支えありませんが、使用後は−25～−15℃で冷凍保存してください。

PCR増幅液の容器を開封する際は、PCR産物の飛散に十分注意して行ってください。

② 標準DNAプレートへの添加

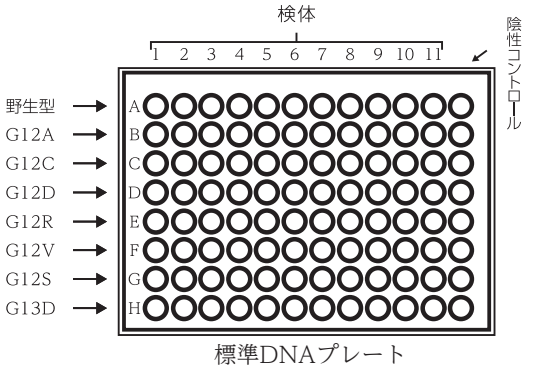
蛍光色素の劣化を防止するため、標準DNAプレートは使用直前まで遮光アルミ袋で保管してください。

標準DNAプレートは使用する前に室温に戻しておき、使用直前にプレートシールを静かにはがしてください。

標準DNAプレートのウェルに、①で調製したF-PHFA反応液（陰性コントロールのF-PHFA反応液を含む）を1検体につき、縦方向にウェルAからHへ20μLずつ添加してください。プレートの向きを間違えないように注意してください。リアルタイムPCR用マイクロプレートカバーシールで封をした後、プレート用ミキサーで撹拌してから、遠心してください。

標準DNAプレートは、上下逆さにしないでください。また、蛍光灯などの光に長時間さらさないようご注意ください。

1枚の標準DNAプレートで、陰性コントロールを含む12検体を同時に測定できます。

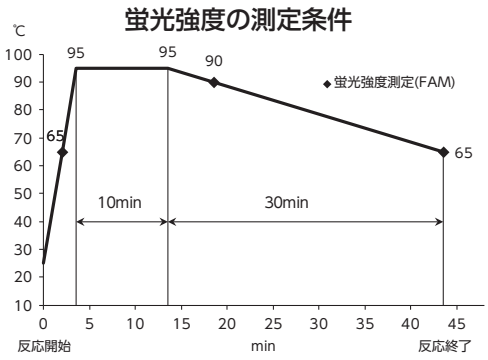


標準DNAプレート

③ 蛍光強度の測定

リアルタイムPCR装置（CFX96リアルタイムPCR解析システムなど）により、調製した標準DNAプレートの測定を行います。まず、加熱変性の昇温過程の65℃において450～490nmの励起光から得られる515～530nmにおけるF-PHFA反応前のFAMの蛍光強度を測定します。次に、

95℃で10分間加熱変性させた後、95℃から65℃へ降温させながらFAMの蛍光強度を30分間で測定します（下図）。



測定して得られた蛍光強度を、本製品専用のMicrosoft Office Excelのインデックス算出用シート「OncoGuide KRAS Mutation Detection Kit Index Sheet」に入力します。

標準DNAプレートを測定装置に装着する際、プレートの向きを間違えないように注意してください。

測定後は、標準DNAプレートからリアルタイムPCR用マイクロプレートカバーシールをはがさずに、そのまま廃棄してください。シールをはがすと、PCR産物による汚染の危険性が高まります。

【測定結果の判定法】

＊1．測定結果の補正とインデックス値の算出

・「**【用法・用量（操作方法）】3-3 F-PHFA反応**」で測定して得られた蛍光強度をインデックス算出用シートに入力し、標準DNAプレート各ウェルでの蛍光強度の補正およびインデックス値を算出します。

・蛍光強度の補正、インデックス値の算出は式1により行います。インデックス算出用シートを使用しない場合、手計算でインデックス値を算出することも可能です。

$$式1：インデックス値=\frac{(蛍光強度[90℃]-蛍光強度[反応後：65℃])}{(蛍光強度[90℃]-蛍光強度[反応前：65℃])}\times 100$$

＊2．インデックス値による陽性・陰性の判定

・表3に示したインデックス値の閾値を参照して、各標準DNAに対応したKRAS遺伝子変異への陽性または陰性の判定を各ウェルのインデックス値で行います。インデックス値が閾値未満となった場合は陽性、閾値以上となった場合は陰性と判定します。

表3．各標準DNAのインデックス値の閾値

標準DNA	閾値
野生型	55.0
G12A	55.0
G12C	60.0
G12D	55.0
G12R	65.0
G12V	50.0
G12S	55.0
G13D	55.0

3．判定結果の有効性の判断

・最終的に、表4に示すそれぞれの陽性および陰性の判定結果の組み合わせから、判定結果の有効あるいは無効を判断します。判定結果が無効と判断された場合は、再試験を行ってください。

表4．判定結果の有効あるいは無効の判断基準

判定結果は有効	A	野生型と変異型の両方で陽性を示す場合	陽性を示した変異型と判定する
	B	野生型は陰性で、変異型でのみ陽性を示す場合	
	C	野生型のみ陽性を示す場合	野生型と判定する
必要とする判定結果は無効であり再試験を	D	野生型および変異型のいずれでも陽性を示さない場合	PCR増幅液の電気泳動で目的のPCR産物のバンドが見られる場合は、それ以降の操作に誤りがある可能性が高く再試験とする 目的のPCR産物のバンドが見られない場合は、再試験とする
	E	陰性コントロールの検体が、野生型あるいは変異型のいずれかで陽性を示した場合	PCRにおけるキャリーオーバーコンタミネーションが疑われるため、再試験とする

・A、Bの場合は、変異型と判定します。一般的には野生型が同時に陽性になる場合が多いのですが、検体の大部分ががん細胞である場合、まれに野生型が陰性となります。また、複数の変異型が検出される場合もあります。

・Cの場合は、野生型のみ、あるいは変異型が検出限界以下です。

・Dの場合は、PCR増幅液の電気泳動で目的のPCR産物のバンドが検出されていても、PCR反応以降の操作に誤りがあるとDの結果が得られます。また、電気泳動で目的のPCR産物のバンドが検出されないかバンドが薄い場合も、Dの結果が得られます。いずれも判定結果は無効と判断し、再試験を行ってください。

・Eの場合は、キャリーオーバーコンタミネーションが強く疑われるため、判定結果は無効と判断しPCR産物の除染作業を行った後、再試験を行ってください。

[判定上の注意]

PCRの増幅効率が低いと変異型DNAが存在するにも関わらず、野生型のみが陽性となりCの判定となることがあります。その場合は、電気泳動にて目的のPCR産物のバンドが明瞭に検出できるかを確認してください。また、野生型のみ陽性を示し、野生型のインデックス値が20を超える場合はPCRの増幅効率が低下している可能性があるため、DNA量を増やすなどして再試験することを推奨します。

【臨床的意義】

これまで、KRAS遺伝子に変異のある大腸がん患者では、抗EGFR抗体薬であるセツキシマブあるいはパニツムマブの治療は効果がなく、KRAS遺伝子変異を検査することにより、抗EGFR抗体治療の効果を予測できることが、多くの臨床試験成績[2)]より明らかになっています。そこで、国内外の大腸がん治療ガイドライン等[1)]において、抗EGFR抗体治療に先立ち、KRAS遺伝子変異検査を実施することが求められています。

吉野らの大規模な転移性大腸がんKRAS観察研究報告のデータに基づくと[3)]、大腸がん患者におけるKRAS遺伝子型の割合は、野生型と7種類のKRAS遺伝子変異（G12A、G12C、G12D、G12R、G12V、G12S、G13D）の合計が症例数全体の99.6%を占めていることがわかりました。また、転移性大腸がんでのKRAS遺伝子変異検出は負の予測因子であることから、KRAS遺伝子変異検出の種類が主要な7種類に限られることは妥当と考えられます。

従来、KRAS遺伝子変異検出は、主にダイレクトシークエンシング法が用いられていました。しかし、操作が煩雑であり多数検体の解析に時間がかかる、施設間差があるといった欠点がありました。

本製品は、生体由来の組織中のKRAS遺伝子のコドン12およびコドン13の7種類の変異（G12A、G12C、G12D、G12R、G12V、G12S、G13D）の有無を簡便に検出することができ、1枚の標準DNAプレートで、陰性コントロールを含む12検

体の測定が同時に可能な試薬で、ダイレクトシークエンシング法の判定結果と高い相関を示し、抗EGFR抗体薬の有効性評価のための検査方法として有用です。

【性能】

1．性能

以下の自家管理検体を使用して試験し、適合することを確認します。

・自家管理検体：本製品による試験においてPCR増幅が可能であり、本製品の操作で得られるPCR産物と同じ鎖長、同じ塩基配列をもつ2本鎖DNAで、それぞれの遺伝子型に相当する塩基配列をもつ化学合成オリゴヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖を当量混合したものです。1回のF-PHFA反応に用いる総量は250,000分子です。

1-1 感度試験

自家管理検体を試験したとき、自家管理検体に含まれる変異型と対応する標準DNAプレートのウェルでの判定が、すべて有効で陽性を示す。

1-2 正確性試験

自家管理検体を試験したとき、自家管理検体に含まれる変異型と対応する標準DNAプレートのウェルでの判定がすべて有効で陽性を示し、対応しない標準DNAプレートのウェルでの判定がすべて有効で陰性を示す。

1-3 同時再現性試験

自家管理検体を3回繰り返し試験したとき、3回の判定が有効で同一である。

2．最小検出感度

変異型DNA含有率（全ての変異型）10%

3．臨床性能試験結果

大腸がん165症例に関して、FFPE組織から抽出したゲノムDNAを使用し、本製品およびダイレクトシークエンシング法によるKRAS遺伝子変異検査を実施しました。本製品およびダイレクトシークエンシング法により得られた判定結果を比較し、両方法での一致率を求めることで、本製品の性能を評価しました。

本製品の判定結果とダイレクトシークエンシング法による判定結果を以下に示します。腫瘍部削り取り実施、未実施いずれの検体においても、本製品の判定結果はダイレクトシークエンシング法の判定結果と良好な相関を示しました。

本製品とダイレクトシークエンシング法の相関

解析対象：165検体（相関は、ダイレクトシークエンシング法で解析出来なかった1検体を除き求めた）		ダイレクトシークエンシング法の結果（腫瘍部削り取りあり）		
		野生型	変異型	解析不可
本製品の結果（腫瘍部削り取りなし）	野生型	105	1（注）	0
	変異型	0	58	1
	解析不可	0	0	0

判定一致率：99.4%（163例 / 164例）
野生型正診率：100.0%（105例 / 105例）
変異型正診率：98.3%（58例 / 59例）
（注）この1検体は、本製品の検出対象としていない稀な変異型（コドン13D変異GRY）でした。

本製品における腫瘍部削り取り実施の影響

解析対象：165検体		本製品の結果（腫瘍部削り取りあり）	
		野生型	変異型
本製品の結果（腫瘍部削り取りなし）	野生型	106	0
	変異型	0	59

判定一致率：100.0%（165例 / 165例）
野生型一致率：100.0%（106例 / 106例）
変異型一致率：100.0%（59例 / 59例）

本製品の判定結果は、腫瘍部削り取り実施、未実施いずれの検体においても、完全一致しました。なお、本製品の腫瘍部比率（面積比率）と変異型検出率について以下に示します。

腫瘍部比率（面積比率）と変異型検出率

腫瘍部比率	検体数	野生型検体数	変異型検体数	変異型検出率
60%以上	27	14	13	48%
45%, 50%, 55%	27	17	10	37%
35%, 40%	35	22	13	37%
25%, 30%	34	24	10	29%
15%, 20%	34	25	9	26%
10%以下	8	4	4	50%
合計	165	106	59	36%

【使用上または取扱い上の注意】

1．取扱い上（危険防止）の注意

・検体および本製品の取扱いや検査に際しては、人体に直接触れないよう使い捨て手袋、マスク、保護用眼鏡などを着用してください。また、口によるピペッティングを行わないでください。

・試薬が誤って目や口に入った場合は、多量の水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当等を受けてください。試薬が誤って皮膚や粘膜に付着した場合には、多量の水で十分に洗い流してください。

・検体および本製品を取扱う区域内では、飲食および喫煙をしないでください。

・使用した器具類やPCR産物で汚染された可能性のある実験台などは、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度5000ppm、1時間以上浸漬）などによる洗浄や清掃を行ってください。

2．使用上の注意

・使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

・貯蔵方法に従いプライマーミックス溶液、F-PHFA Bufferは、−25～−15℃（冷凍）で保存し、標準DNAプレートは2～8℃（冷蔵）で遮光し、保存してください。

3．廃棄上の注意

・ゲノムDNA抽出に用いた組織材料、および使用した器具などはオートクレーブ（121℃、20分間）処理してください。

・ゲノム抽出後の本製品を含めた試薬、ゲノムDNAおよびPCR産物を扱ったピペットなどの器具は0.1%濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液で払拭し、ピペット用チップやプラスチック容器は同濃度次亜塩素酸ナトリウム溶液に侵清したのち廃棄してください。これらの器具はオートクレーブ処理をしないでください。DNAはオートクレーブでは十分分解せず、汚染の拡大につながる危険性があります。

・オートクレーブ処理あるいは次亜塩素酸ナトリウム溶液処理した組織材料、ピペット用チップおよびプラスティック類は廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物または産業廃棄物などの区別をして処理してください。

・試薬、処理した検体および使用した器具などを廃棄する場合には、各自治体などの廃棄物に関する規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1．貯蔵方法

・プライマーミックス溶液、F-PHFA Buffer
　－25～－15℃（冷凍）で保存してください。
・標準DNAプレート
　2～8℃（冷蔵）で遮光し、保存してください。

2．有効期間

・製造日から18ヶ月
　使用期限は外箱に記載してあります。

【包装】

1キット

【主要文献】

1）日本臨床腫瘍学会「大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス 第1版」2008年 11月

2）Allegra CJ. et al.: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. J. Clin. Oncol. 27:2091-2096, 2009.

3）Yoshino, T. et al.: Clinicopathological features in metastatic colorectal cancer patients with KRAS wild type versus codon 12 and codon 13 mutant: Results from a multicenter, cross-sectional study by the Japan Study Group of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. ASCO Gastrointestinal Cancers symposium, abstr. No. 407, 2011.

【問合せ先】

アルフレッサファーマ株式会社
〒540-8575　大阪市中央区石町二丁目2番9号
TEL. 06-6941-0308
FAX. 06-6941-4861

販売元　alfresa
アルフレッサ ファーマ株式会社
大阪市中央区石町二丁目2番9号

製造販売元　riken genesis
株式会社理研ジェネシス
東京都台東区台東一丁目5番1号